

III. METODE PENELITIAN

3.1. Tempat Dan Waktu

Penelitian ini akan dilakukan di Balai Besar Perbenihan dan Proteksi Tanaman Perkebunan (BBPPTP) Surabaya, alamat Jln. Mojoagung No. 52, Kec. Mojoagung, Kab. Jombang, Provinsi Jawa Timur. Penelitian ini dilakukan selama 25 hari.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat yang dibutuhkan adalah cawan petri kecil diameter 9 cm dan cawan petri besar diameter 14 cm, botol isolat untuk Nematoda Entomopatogen (NEP), cawan hitung, handcounter, gelas ukur, toples, mikroskop, pipet tetes, pinset, kuas, dan nampan.

3.2.2. Bahan

Bahan yang dibutuhkan adalah isolat Nematoda Entomopatogen (NEP) *Heterorhabditis*, larva *Oryctes rhinoceros* L. (Kumbang badak) instar II, larva *Spodoptera litura* instar III, aquades, label, wrapping, tissue, dan kertas saring merek whatman diameter 9 cm dan 14 cm.

3.3. Metode Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana, perlakuannya adalah populasi Infektif Juvenil (IJ)/ml Nematoda Entomopatogen (NEP) : P0 (Populasi 0 IJ/ml), P1 (Populasi 100 IJ/ml), P2 (Populasi 200 IJ/ml), P3 (Populasi 300 IJ/ml), P4 (Populasi 400 IJ/ml), dan P5 (Populasi 500 IJ/ml). Setiap perlakuan diujikan sebanyak 5 larva *Oryctes rhinoceros* L. dan 10 larva

Spodoptera litura. Jadi, penelitian ini menggunakan 6 taraf perlakuan dan diulang sebanyak 4 kali sehingga total terdapat 24 perlakuan.

3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Perbanyakan Nematoda Entomopatogen di Laboratorium

Nematoda Entomopatogen diperbanyak dengan menggunakan ulat *Spodoptera litura* L. dengan cara menginfeksi ulat tersebut dengan isolat nematoda entomopatogen spesies *Heterorhabditis* yang sudah tersedia pada berbagai populasi 0 IJ/ml, 100 IJ/ml, 200 IJ/ml, 300 IJ/ml, 400 IJ/ml, dan 500 IJ/ml. Kemudian melakukan *White trap*, yaitu ulat yang mati diletakkan ke dalam cawan petri yang berdiameter 9 cm yang telah dialasi dengan kertas saring, dan dilembapkan dengan memberikan aquades. Cawan petri tersebut diletakkan di dalam petri besar yang berukuran diameter 14 cm yang diisi dengan air dengan ketinggian 0,5 cm, Selanjutnya diinkubasi selama ± 7 hari. Nematoda entomopatogen akan masuk ke dalam air dan dilakukan pemanenan Nematoda entomopatogen setiap hari sampai hasil nematoda entomopatogen cukup untuk pengaplikasian. Pemanenan dapat dilakukan setiap 2 hari sekali selama 2 minggu dengan tetap menambahkan air dalam cawan petri besar. Hasil panen yang diperoleh kemudian disimpan dalam botol kaca.

3.4.2. Persiapan Larva *Oryctes rhinoceros* L. (Kumbang badak) dan Larva *Spodoptera litura*

Pencarian larva *Oryctes rhinoceros* L., diambil di areal tanaman kelapa yang sudah membusuk, atau juga bisa ditemukan pada tumpukan sampah. Larva yang dibutuhkan untuk penelitian ini berlangsung pada instar II, stadium larva instar II ini berlangsung selama 12 – 21 hari (Mohan, 2006). Larva *Oryctes*

rhinoceros L. instar II yang dibutuhkan dalam pengaplikasian adalah sebanyak 120 larva. Setiap perlakuan diberikan 5 larva pada cawan petridis. Sedangkan untuk larva *Spodoptera litura* berlangsung pada instar III yang dibutuhkan pengaplikasian adalah sebanyak 240 larva, jadi setiap perlakuan diberikan 10 larva pada cawan petridis.

3.4.3. Penghitungan Kepadatan Populasi NEP di Laboratorium

Air hasil *White trap* yang mengandung Nematoda Entomopatogen dituangkan pada gelas objek yang telah diberi garis bantu menggunakan spuit. Kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 10x. Selanjutnya melakukan penghitungan isolate nematoda entomopatogen spesies *Heterorhabditis* yang diulang sebanyak 4x dengan rumus sesuai dengan perlakuan yang akan diaplikasikan.

Perhitungan populasi NEP untuk larva *Oryctes rhinoceros* L.

$$\begin{aligned}
 \text{Populasi NEP} &= \frac{P_1 + P_2 + P_3 + \dots + P_n}{n} \\
 &= \frac{147 + 71 + 102 + 82}{4} \\
 &= \frac{402}{4} \\
 &= 100,5 \text{ IJ}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Jumlah perlakuan} \quad P_1 \text{ 100 IJ/ml} &= 100 \text{ IJ/100 IJ} \\
 &= 1 \text{ ml} \\
 P_2 \text{ 200 IJ/ml} &= 200 \text{ IJ/100 IJ} \\
 &= 2 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

$$P3 \ 300 \text{ IJ/ml} = 300 \text{ IJ/100 IJ}$$

$$= 3 \text{ ml}$$

$$P4 \ 400 \text{ IJ/ml} = 400 \text{ IJ/100 IJ}$$

$$= 4 \text{ ml}$$

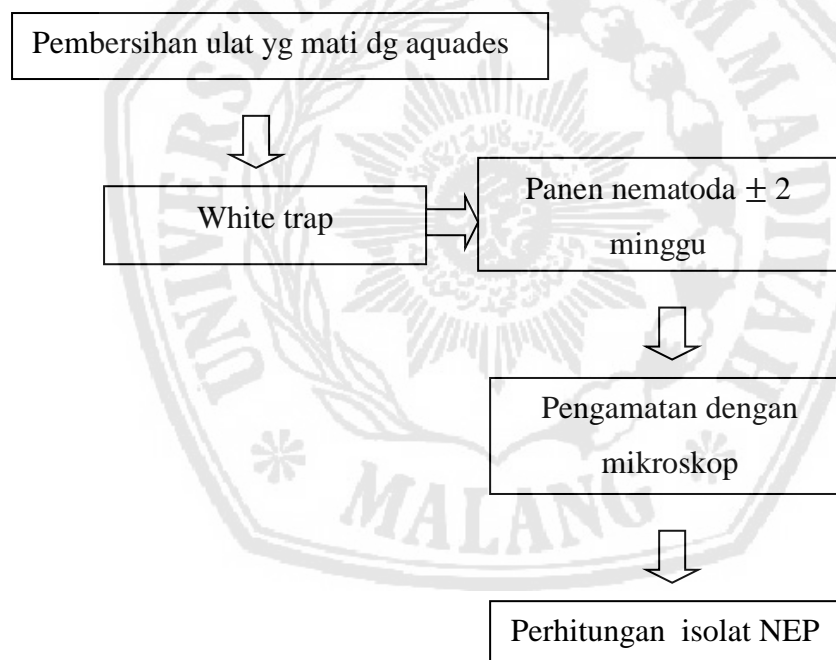
$$P5 \ 500 \text{ IJ/ml} = 500 \text{ IJ/100 IJ}$$

$$= 5 \text{ ml}$$

Keterangan : P = Populasi NEP per 1 ml

n = Banyaknya ulangan

Alur Pekerjaan



3.4.4. Uji Nematoda Entomopatogen Pada Salah Satu Larva *Oryctes rhinoceros* L. dan larva *Spodoptera litura*

Uji aplikasi Nematoda Entomopatogen dilakukan untuk mengetahui kepadatan populasi Nematoda Entomopatogen yang dapat menyebabkan

mortalitas larva *Oryctes rhinoceros* L. dan *Spodoptera litura*. Uji dilakukan dengan membuat 6 macam tingkat atau level perlakuan.

Adapun susunan tingkat perlakuan yang diujikan diantaranya :

P0 : Kontrol (0 IJ/ml)

P1 : 100 IJ/1ml

P2 : 200 IJ/2ml

P3 : 300 IJ/3ml

P4 : 400 IJ/4ml

P5 : 500 IJ/5ml

Skema Uji

I	II	III	IV
P0	P0	P0	P0
P1	P1	P1	P1
P2	P2	P2	P2
P3	P3	P3	P3
P4	P4	P4	P4
P5	P5	P5	P5

Keterangan : Ulangan = I, II, III, dan IV

Perlakuan = P0 (0 IJ/ml), P1 (100 IJ/1ml), P2 (200 IJ/2ml), P3 (300 IJ/3ml), P4 (400 IJ/4ml), dan P5 (500 IJ/5ml)

Adapun Tahapan Pengaplikasian NEP untuk pengendalian larva *Oryctes rhinoceros* L. dan larva *Spodoptera litura* sebagai berikut:

1. Menyiapkan larva *Oryctes rhinoceros* L. instar II sebanyak 120 larva dan larva *Spodoptera litura* instar III sebanyak 240 larva.
2. Menyiapkan NEP ke dalam botol *Sprayer* dengan 6 tingkat kepadatan populasi, mulai dari 0 IJ/ml, 100 IJ/ml, 200 IJ/ml, 300 IJ/ml, 400 IJ/ml, dan 500 IJ/ml. Untuk mengetahui kepadatan populasi nematoda, dilakukan penghitungan populasi nematoda isolat dengan menggunakan mikroskop stereo, cawan hitung, dan *Hand Counter*
3. Memasukkan larva *Oryctes rhinoceros* L. instar II ke dalam cawan petri ukuran 14 cm. Setiap cawan petri diberi 5 larva *Oryctes rhinoceros* L. Sedangkan pada larva *Spodoptera litura* instar III dengan petri ukuran 9 cm dan setiap cawan petri diberi 10 larva *Spodoptera litura*.

Nilai ambang ekonomi untuk hama kumbang *Oryctes rhinoceros* L. adalah

- 15 – 25 % daun kelapa sampel terserang
- Lebih dari 1 ekor lundu dibawah pohon kelapa sampel

4. Mengaplikasikan Nematoda Entomopatogen dengan cara menyemprotkan suspensi IJ sesuai perlakuan dengan cara menggunakan *hand sprayer* ke tubuh serangga uji
5. Mengamati perubahan perilaku yang terjadi pada larva *Oryctes rhinoceros* L. dan larva *Spodoptera litura* setelah aplikasi NEP. Perubahan perilaku tersebut seperti perubahan warna, perilaku gerak, dan bentuk tubuh larva sampai larva tersebut mati.

6. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai persentase mortalitas larva *O. rhinoceros* L. 100% setelah pengaplikasian.
7. Memasukkan data jumlah mortalitas larva ke dalam tabel pengamatan presentase kematian larva.

3.5. Variabel Pengamatan

Variabel pengamatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Perbanyak Nematoda Entomopatogen dengan menggunakan larva *Spodoptera litura* dengan menggunakan teknik *white trap*. Teknik *white trap* dilakukan dengan cara meletakkan larva *Spodoptera litura* yang mati pada kertas saring diatas cawan petri berukuran 9 cm yang diletakkan terbalik. Cawan yang berukuran 9 cm diletakkan didalam cawan petri besar berdiameter 14 cm. Di dalam cawan petri besar diisikan aquadest sampai mencapai setengah permukaan cawan petri tempat larva *Spodoptera litura* diletakkan pada cawan petri 9 cm sehingga kertas saring selalu terendam air. Cawan petri besar ditutup dan di wrapping kemudian diletakkan pada suhu kamar.
2. Data kematian larva *Spodoptera litura* diamati setiap hari
3. Gejala Serangan Nematoda Entomopatogen pada Larva *O. rhinoceros* L. Pengamatan dilakukan secara mikroskopis, setelah larva mati dengan cara membedah tubuh larva selanjutnya diamati di bawah mikroskop untuk melihat kerusakan jaringan yang terjadi dan memastikan terdapat keberadaan

nematoda di dalam tubuh larva sebagai penyebab kematian larva *O. rhinoceros* tersebut.

4. Persentase Mortalitas Larva *O. rhinoceros* L. dan larva *Spodoptera litura*

Pengamatan tersebut dilakukan dengan menghitung jumlah larva yang mati dan kemudian dihitung persentase mortalitas larva. Perhitungan mortalitas larva dilakukan setiap hari. Persentase mortalitas larva dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$P = \frac{a}{a + b} \times 100 \%$$

Dimana :

P = Persentase mortalitas larva

a = Jumlah larva yang mati

b = Jumlah larva yang hidup

5. Kepadatan Populasi Nematoda Entomopatogen Pada Larva *Oryctes rhinoceros* L.

Pengamatan dilakukan dengan membedah tubuh larva *Oryctes rhinoceros* L.

3.6. Analisis Data

Data dianalisis dengan menggunakan Uji F pada taraf 5% dan 1%. Jika berbeda nyata maka akan dilanjutkan dengan Uji BNJ taraf 5%.